

[25] ALAVANJA M C, DOSEMECI M, SAMANIC C, et al. Pesticides and lung cancer risk in the agricultural health study cohort [J]. *Am J Epidemiol*, 2004, 160(9): 876-885.

[26] MAHAJAN R, BLAIR A, LYNCH C F, et al. Fonofos exposure and cancer incidence in the agricultural health study [J]. *Environ Health Perspect*, 2006, 11(12): 1838-1842.

[27] 美国报告:这19种化学物质已被列为可能致癌物质 [EB/OL] (2010-07-17) [2010-07-17]. [http://health.ifeng.com/news/news/detail\\_2010\\_07/17/1786829\\_1.shtml](http://health.ifeng.com/news/news/detail_2010_07/17/1786829_1.shtml).

[28] 温焕平,余涛,练翠雯,等. 2004-2006年肇庆市部分食品化学污染状况分析 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2007, 17(10): 1874-1875.

[29] 荆俊杰,谢吉民,朱卫华,等. 丹徒区恶性肿瘤患病率与环境部分微量元素的关系 [J]. *江苏大学学报*, 2005, 15(1): 44-45.

[30] 谢吉民. 无机化学 [M]. 北京:人民卫生出版社, 2003: 195.

[31] 张磊,彭少杰,戚柳斌,等. 2006-2007年上海市市售食品污染物监测结果分析 [J]. *环境与职业医学*, 2008, 25(4): 337-341.

[32] 韩方岸,胡云,吉文亮,等. 长江江苏段主要城市水源有机污染物分布研究 [J]. *实用预防医学*, 2009, 16(1): 3-10.

### 论著

## 食品中单核细胞增生李斯特菌株的分离及聚合酶链式反应鉴定

曾大红,段丽粟,唐俊妮,陈娟,王洪志,龙虎

(西南民族大学生命科学与技术学院,四川 成都 610041)

**摘要:**目的 建立单核细胞增生李斯特菌的聚合酶链式反应(PCR)检测方法,了解市售食品中单核细胞增生李斯特菌的污染情况。**方法** 采集成都市市售生畜肉、生禽肉、熟肉制品、水产品、生食蔬菜以及其他熟食等食品样品共135份,采用李氏增菌肉汤(LB1, LB2)进行初增菌,应用选择性分离培养基PALCAM和在TSA-YE平板上进行分离,利用单增李斯特显色平板进行鉴定;根据李斯特菌的特异性基因*iap*基因设计引物,采用PCR方法检测所有分离的李斯特菌株;根据单增李斯特菌的特异性基因*hly*基因和*prfA*基因设计引物检测单核细胞增生李斯特菌株。**结果** 135份样品中共检出李斯特菌17株,检出率为12.6%;其中单核细胞增生李斯特菌4株,检出率为3.0%。**结论** 本研究建立的PCR方法具有特异性,本市市售食品不同程度受到李斯特菌的污染。

**关键词:**李斯特菌; *iap* 基因; *hly* 基因; *prfA* 基因; 聚合酶链式反应; 食品污染

中图分类号: R378.994 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2011)05-0394-05

### Isolation of *Listeria* strains from food and identification of *Listeria monocytogenes* with polymerase chain reaction

Zeng Taihong, Duan Lili, Tang Junni, Chen Juan, Wang Hongzhi, Long Hu  
(College of Life Science and Technology, Southwest University for Nationalities,  
Sichuan Chengdu 610041, China)

**Abstract: Objective** To develop a specific PCR detection method for *L. monocytogenes* and to investigate the contamination of *L. monocytogenes* in different foods in Chengdu city. **Methods** A total of 135 random samples from sorts of meat, fish, dairy, vegetable and other ready-to-eat food were collected from free markets and supermarkets. The samples were followed an enrichment period with LB1 and LB2 broth, then separated and identified by using PALCAM medium, TSA-YE agar and CHROMagar™ *Listeria*. The virulence gene *iap* was used to examine all *Listeria* strains. The specific *hly* and *prfA* genes were used to identify all *L. monocytogenes* strains. **Results** Among 135 collected samples, 17 (12.6%) were contaminated by *Listeria* species; 4 (3.0%) were contaminated by *L. monocytogenes*. **Conclusion** PCR method is a simple and rapid technique for the detection of *L. monocytogenes*. The contamination of investigated food caused by

收稿日期: 2011-01-21

基金项目: 四川省杰出青年学术技术带头人培育计划 (2011JQ0043); 西南民族大学 2010 年大学生创新活动 (F201013001)

作者简介: 曾大红 女 本科

通信作者: 唐俊妮 女 博士 (后) 副研究员 研究方向为食品质量与安全 E-mail: junneytang@yahoo.com.cn

*Listeria* in Chengdu was in different degrees.

**Key words:** *Listeria*; *iap* gene; *hly* gene; *prfA* gene; polymerase chain reaction; food contamination

单核细胞增生李斯特菌 (*L. monocytogenes*) 属于李斯特菌属, 它能引起人、畜的李斯特菌病。李斯特菌病是一种人畜共患病, 对孕妇、新生儿、老年人和免疫缺陷病人危害严重、致死率高, 死亡率可达 30%<sup>[1]</sup>。美国疾病预防控制中心报道, 美国每年有 2 000 多例严重的病症是由单核细胞增生李斯特菌引起的, 其中死亡患者达到 500 例, 因此, WHO 已将其列为食品中四大重要的致病菌之一<sup>[2]</sup>。

为了掌握四川省成都市食品中单核细胞增生李斯特菌的污染情况, 本研究从生畜肉、生禽肉、熟肉制品、水产品、生食蔬菜以及其他熟食等食品样品中检测分离出李斯特菌疑似菌株, 并采用聚合酶链式反应 (PCR) 方法进行鉴定。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品来源

2010 年 3—10 月, 从四川省成都市主要大型超市和菜市场采集生畜肉、生禽肉、熟肉制品、水产品、生食蔬菜、蔬菜沙拉以及其他熟食等食品样品总计 135 份。

### 1.2 培养基和试剂

李氏增菌肉汤 (LB1, LB2); 0.6% 酵母浸膏的胰酪陈大豆肉汤和琼脂 (TSB-YE; TSA-YE); PALCAM 琼脂; 李斯特显色培养基 CHROMagar™ *Listeria* (法国科玛嘉公司)。TE (10 mmol/L Tris. Cl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0); 10% SDS; 蛋白酶 K (10 mg/ml); 溶菌酶 (20 mg/ml); 饱和酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1); 丙酮; 无水乙醇; 含 10% 蔗糖的 TE 缓冲溶液; CTAB/NaCl (1% CTAB, 0.73 mol/L NaCl); NaAc (3 mol/L); NaCl (5 mol/L); RNase (1 mg/ml); 琼脂糖; LB 培养基; 1 × TAE buffer; 所有试剂均按文献 [3] 配制; PCR 扩增试剂购自宝生生物公司; 引物由上海生工合成。

### 1.3 标准菌株

单核细胞增生李斯特菌标准菌株 (*L. monocytogenes* strain) 由本实验室保存。

### 1.4 方法

#### 1.4.1 菌株分离和鉴定

取 25 g 固体样品或吸取 25 ml 液体样品, 加入 225 ml 灭菌生理盐水, 固体样品研磨并均质制成混悬液, 分别取 25 g (ml) 加入 225 ml LB1 增菌液, 充分混匀, 置 30 °C 培养 24 h 后, 取出 1 ml 加入 10 ml LB2 增菌液中, 30 °C 继续培养 24 h。在选择性分离

培养基 PALCAM 琼脂上进行分离培养, 35 °C 培养 48 h (如果培养时间过长, 则整个平皿为黑色), 挑取灰绿色, 菌落周围有棕黑色环的可疑菌落接种到 TSA-YE 培养基上, 于 37 °C 培养 24 h。将挑选的疑似菌落接种后涂布在李斯特菌显色培养基平板上, 整个平板出现浅蓝色可鉴定为单核细胞增生李斯特菌株, 同时采用 PCR 方法进一步鉴定。

#### 1.4.2 菌株 DNA 提取

具体操作见文献 [4]。

#### 1.4.3 李斯特菌 *iap* 基因及比对

*iap* 基因是所有李斯特菌的外蛋白的编码基因, 也是李斯特菌的特异性基因。在 GenBank 上获得 11 条不同李斯特菌株的 *iap* 基因 (表 1), 采用 ClustalX2.0 软件进行比对分析。

#### 1.4.4 PCR 扩增引物

根据所有李斯特菌 *iap* 基因的前后两段设计一对保守引物, 上游: *iap*F-5'-ATgAATATgAAAAAgCAAC-3'; 下游: *iap*R-5'-TTATACgCgACCgAAgCCAAC-3'; 不同的李斯特菌株扩增产物分别在 1 413 ~ 1 575 bp 之间, 见表 1。

表 1 不同李斯特菌株 *iap* 基因描述

Table 1 The description of *iap* gene in different *Listeria* strains

序号	基因及菌株特征描述	长度 (bp)
1	<i>Listeria welshimeri</i> extracellular protein homologue ( <i>iap</i> ) gene	1575
2	<i>Listeria welshimeri</i> <i>iap</i> -related gene	1575
3	<i>Listeria ivanovii</i> extracellular protein homologue ( <i>iap</i> ) gene	1575
4	<i>Listeria seeligeri</i> extracellular protein homologue ( <i>iap</i> ) gene	1572
5	<i>Listeria monocytogenes</i> strain IMVW479 invasion associated protein p60 ( <i>iap</i> ) gene	1434
6	<i>Listeria monocytogenes</i> serotype 4b str. CLIP, <i>iap</i> ; p60	1492
7	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>iap</i> -related gene	1437
8	<i>Listeria monocytogenes</i> strain 10403S <i>Iap</i> ( <i>iap</i> ) gene	1431
9	<i>Listeria monocytogenes</i> HCC23, <i>iap</i> ; p60	1413
10	<i>Listeria innocua</i> extracellular protein homologue ( <i>iap</i> ) gene	1575
11	<i>Listeria grayi</i> extracellular protein homologue ( <i>iap</i> ) gene	1536

单核细胞增生李斯特菌 PCR 扩增选择的是单增李斯特的特异性基因 *prfA* 和 *hly* 基因, 采用 Primer Premier 5.0 软件设计引物, 引物序列见表 2, 采用 BLAST 对引物序列进行比对。

表 2 *prfA* 和 *hly* 引物名称及序列  
Table 2 Primers for *prfA* and *hly* gene

引物名称	碱基序列(5'—3')	扩增产物大小 (bp)
<i>prfA</i> -1	5'-TATGTGCGATACCGCTTGAA-3'	511
<i>prfA</i> -2	5'-GAAACTAACGGGATAAAACC-3'	
<i>hly</i> -1	5'-TTATGATGACGAAATGGCTTAC-3'	789
<i>hly</i> -2	5'-ATGGACGATGTGAAATGAGC-3'	

### 1.4.5 李斯特菌株和单核细胞增生李斯特菌株的 PCR 鉴定

采用李斯特菌株特异性基因 *iap* 的引物 *iapF* 和 *iapR* 先对疑似菌株进行初步鉴定,然后再从筛选的李斯特菌株中,利用 *prfA* 基因和 *hly* 基因的两对引物,采用双重 PCR 进行单核细胞增生李斯特菌的检测。

PCR 扩增条件:95 ℃ 预变性 5 min,按 95 ℃,45 s;53 ℃ (*iap*) 或 59 ℃ (*prfA*) 或 59 ℃ (*hly*),50 s;72 ℃,45 s 进行 30 个循环,最后 72 ℃ 延伸 8 min。扩增完毕取扩增后的产物 10μl 进行琼脂糖凝胶电泳(1%)检测,80 V,40 min,EB 染色,紫外观察扩增

条带,比较电泳图象。

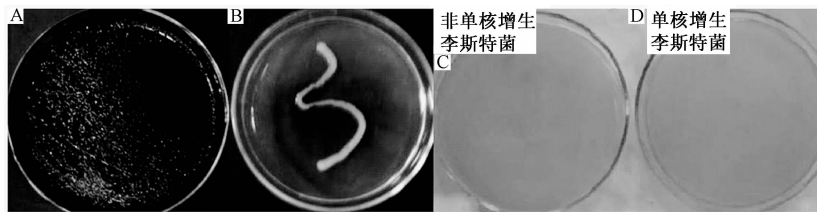
### 1.4.6 检出率统计

经上述分离鉴定出存在单核细胞增生李斯特菌株的样品为阳性样品,从每一份阳性样品中获得并保存 1 株单核细胞增生李斯特菌株。检出率 = (含单增李斯特的阳性样品数/样品总数) × 100%。

## 2 结果与分析

### 2.1 选择性培养基上菌株的分离及显色平板上的鉴定

将 PALCAM 琼脂平板上获得的灰绿色(图 1A)且菌落周围有棕黑色环的疑似菌落接种到 TSA-YE 纯培养基上,形成类似露珠状的菌落形态(图 1B),初步认为从 135 份样品中分离出疑似李斯特菌株 20 株,通过部分菌株的革兰氏染色和镜检,在显微镜下观测为革兰氏阳性小杆菌,湿片镜检出现轻微旋转或翻滚样的运动。非单核细胞增生李斯特菌株在平板上不出现蓝色(图 1C),4 株单核细胞增生李斯特分离菌株在显色平板上出现浅蓝色(图 1D)。



A: 分离菌株在 PALCAM 琼脂平板上的形态; B: 分离菌株在 TSA-YE 培养基上的形态; C: 非单核细胞增生李斯特菌株在显色平板上; D: 单核细胞增生李斯特分离菌株在显色平板上

图 1 分离菌株在选择性培养基和显色平板上的特征

Figure 1 Phenotypic characterization of *Listeria monocytogenes* isolates on PALCAM medium, TSA-YE agar and CHROMagar™ *Listeria*

### 2.2 不同李斯特菌株的 *iap* 基因的比对结果

采用 ClustalX2.0 软件对 11 条不同李斯特菌的 *iap* 基因比对分析部分结果见图 2,所有李斯特菌的前后两段各有 20 几个碱基完全相同,中间的部分差异大。因此,本研究采用的 *iap* 基因的引物选择这两部分,能够扩出所有李斯特菌 *iap* 基因的全长。

### 2.3 *iap* 基因检测结果

利用李斯特特异性基因 *iap* 基因的一对引物分别对 20 株疑似分离菌株的 DNA 进行 PCR 扩增,结果见图 3,共检测出 17 株能产生 *iap* 基因条带的菌株,前面的比较分析表明了 *iap* 基因序列大小针对不同李斯特菌株分别在 1 431 ~ 1 575bp 之间,图 3 中 *iap* 基因 PCR 产物大小与理论相符合,初步判断这些产生条带的菌株为李斯特菌株,135 份样品中检出李斯特菌 17 株。

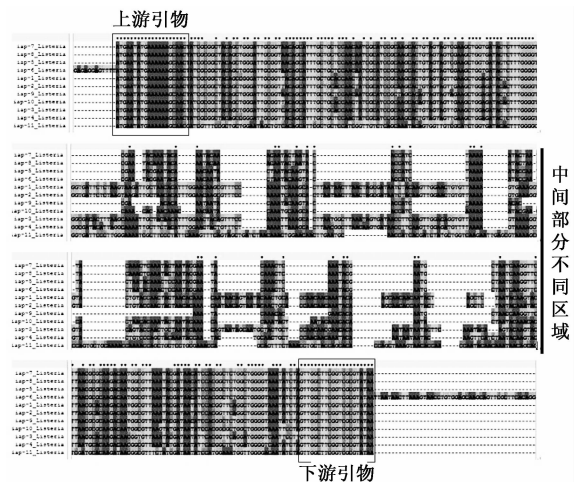
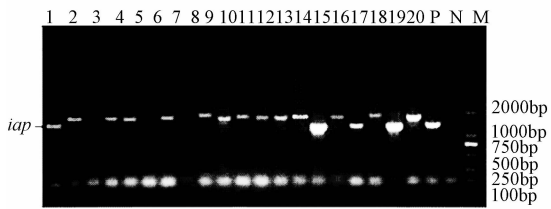


图 2 不同李斯特菌 *iap* 基因的部分比对结果

Figure 2 Analysis of different *iap* genes by ClustalX 2.0



1-20: 分离的不同菌株的*iap*基因的扩增条带; P: 单核细胞增生李斯特菌株的阳性对照; N: 阴性控制; M: DL-2000分子量标准

图3 李斯特菌的*iap*基因PCR扩增结果

Figure 3 PCR products of *iap* fragments from 20 isolated *Listeria* strains

### 2.4 单核细胞增生李斯特菌株的双重PCR鉴定结果

利用单核细胞增生李斯特菌的特异性基因 *hly* 和 *prfA* 进行双重PCR鉴定,结果见图4。泳道1, 15, 17, 19 出现了和标准菌株一样的条带, *hly* 基因扩增大小在 789bp, *prfA* 基因扩增大小在 511bp, 表明这两对引物扩增产物与理论设计值的大小完全符合。135 份样品中检出单核细胞增生李斯特菌 4 株。



1-20: 分离的不同菌株的*hly*和*prfA*基因的扩增结果; P: 单核细胞增生李斯特菌株阳性对照; N: 阴性控制; M: DL-2000分子量标准

图4 单核细胞增生李斯特菌的*hly*基因和*prfA*基因双重PCR鉴定结果

Figure 4 PCR products of *hly* and *prfA* fragments from *Listeria monocytogenes* strains

### 2.5 成都市不同食品中李斯特菌的分布

成都市不同食品中李斯特菌的检出情况见表3,李斯特菌株的检出率为 12.6% (17/135),单核细胞增生李斯特菌的检出率为 3.0% (4/135)。从表中也可以看出李斯特菌主要存在于肉类食品中,特别是生肉制品类,其他食品检出较少或无。

表3 成都市不同食品中李斯特菌的分布

Table 3 Distribution of *Listeria* strains from different foods in Chengdu city

样品来源	数量	李斯特菌 检出份数	单核细胞增生李斯特菌 检出份数
熟肉制品	34	7	1
生肉制品	40	9	3
水产品类	14	0	0
豆制品类	16	1	0
蔬菜类	13	0	0
熟蛋类	7	0	0
其它	11	0	0
合计	135	17	4

### 3 讨论

单核细胞增生李斯特菌是重要的食源性病原菌之一,经常在肉、奶酪和蔬菜等食品中出现。国外每年都有单核细胞增生李斯特菌感染暴发的报道<sup>[5]</sup>,我国各地也从多种食品中分离到了单核细胞增生李斯特菌,但大规模李斯特菌病暴发在我国还没有报道过<sup>[6]</sup>。一方面可能与我国疾病监测方式有关,另一方面与我国居民饮食习惯有关—较少生食肉类等食品,从而大大减少了感染的机会。本试验分离菌株均来源于成都市主要超市和菜市场,分离物包括生畜肉、生禽肉、水产品、熟肉、蔬菜等常见食品。

本研究中,首先采用李斯特菌特有的毒力相关基因 *iap* 基因对所有菌株进行筛选, *iap* 基因是李斯特菌细胞外蛋白 P60 的编码基因,也是李斯特菌的重要抗原,与李斯特菌的毒力密切相关,这个基因可以特异性地识别出不同种属的李斯特菌<sup>[7,8]</sup>。在 PALCAM 琼脂平板上获得的灰绿色疑似菌落一共有 20 株,但是通过 *iap* 基因的验证,筛选出 17 株分离菌株含有 *iap* 基因,其他的菌株均未含有该基因,证实这 17 株菌株为李斯特菌。从另一个侧面也反映了传统的分离培养基结合分子鉴定方法可以提高检测效率和准确性。

单核细胞增生李斯特菌中的 IPIL21 毒力岛 (*Listeria* pathogenicity island 1) 由 *prfA*、*plcA*、*hly*、*actA*、*plcB* 和 *mpl* 6 个基因构成的 *prfA* 调控的基因簇<sup>[9, 10]</sup>。其中, *prfA* 是调控基因,对毒力岛上的其他基因的表达进行调控。 *hlyA* 编码的 listeriolysin O 居核心地位。序列分析表明,单核细胞增生李斯特菌 *hlyA* 基因具有较高的保守性和特异性,选择 *hlyA* 基因合适的片段建立单核细胞增生李斯特菌 PCR 检测方法具有可行性。又因 *hly* 和 *prfA* 两个基因具有关联性,因此,采用双重 PCR 的方法对 17 株李斯特菌株的 DNA 进行扩增。结果显示,4 株分离株同时具有上述两种基因,扩增结果具有特异性,与显色平板上菌株鉴定完全吻合。

综上所述,市售食品中存在食源性李斯特菌的污染,应加强食品监测,预防该菌的传播和食物中毒。

### 参考文献

[1] MAMMINA C, ALEO A, ROMANI C, et al. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from human listeriosis cases in Italy [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47: 2925-2930.

[2] GUENTHER S, HUWYLER D, RICHARD S, et al. Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods [J]. Appl Environ Microbiol, 2009, 75: 93-100.

[ 3 ] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 译. 3 版. 北京:科学出版社,2002.

[ 4 ] 唐俊妮,龙飞,史贤明,等. 金黄色葡萄球菌基因组 DNA 提取方法的比较研究[J]. 中国卫生检验杂志,2008,18(8):1467-1469.

[ 5 ] MEAD P S,DUNNE E F,GRAVES L,et al. Nationwide outbreak of listeriosis due to contaminated meat[J]. *Epidemiol Infect*,2006,134:744-751.

[ 6 ] 骆玲飞,王小光,刘继倩,等. 部分市售农副产品李斯特菌污染情况调查及毒力基因检测[J]. 中国食品卫生杂志,2010,22(3):275-277.

[ 7 ] BUBERT A,KÖHLER S,GOEBEL W. The homologous and heterologous regions within the *iap* gene allow genus-and species-specific identification of *Listeria spp.* by polymerase chain reaction[J]. *Appl Environ Microbiol*,1992,58:2625-2632.

[ 8 ] 吕添,武海涛,曹正茂,等. 单核细胞增多性李斯特菌 *iap* 基因的克隆、表达与 p60 蛋白的纯化[J]. 食品科学,2010,31(11):157-161.

[ 9 ] 谭炳乾,何启盖,肖军,等. 单核细胞增多性李斯特菌 *hlyA* 基因序列及溶血素活性测定[J]. 中国兽医学报,2009,29(2):161-165.

[ 10 ] JUNG H J,PARK S H,HA S D,et al. Species-specific detection of *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction assays targeting the *prfA* virulence gene cluster[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*,2009,73:1412-1415.

论著

化学发光酶免疫分析法快速测定牛奶中恩诺沙星的含量

张慧丽<sup>1,2</sup>,于斐<sup>1</sup>,张静<sup>2</sup>,吴拥军<sup>1</sup>,屈凌波<sup>2</sup>

(1. 郑州大学公共卫生学院,河南 郑州 450001; 2. 郑州大学化学系,河南 郑州 450001)

**摘要:**目的 建立快速测定牛奶中恩诺沙星的化学发光酶免疫检测方法。方法 采用竞争法,即将牛奶样品中的恩诺沙星与标记有碱性磷酸酶的恩诺沙星同时与限量的特异性固相恩诺沙星抗体进行竞争结合反应,通过分离未结合的标记抗原,测定标记抗原与抗体复合物化学发光强度,经相应的数学函数计算出待测抗原的含量。根据这一基本原理,利用金刚烷类体系作为化学发光底物,快速地测定牛奶中恩诺沙星残留量。结果 检出限可达 239.9 pg/ml,检测范围为 350~1 000 pg/ml,批内与批间相对标准偏差均小于 15%。结论 本方法在抗生素恩诺沙星残留检测及监控等领域有很好的应用前景。

**关键词:**化学发光酶免疫法;恩诺沙星;药物残留;食品;牛奶

中图分类号:O657.39 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2011)05-0398-04

Chemiluminescence enzyme immunoassay for detecting enrofloxacin in milk

Zhang Huili, Yu Fei, Zhang Jing, Wu Yongjun, Qu Lingbo

(Department of College of Public Health, Zhengzhou University, Henan Zhengzhou 450001, China)

**Abstract: Objective** To develop a rapid chemiluminescence enzyme immunoassay (CLEIA) for detecting enrofloxacin (ENR) in milk. **Methods** Anti-ENR antibody was passively adsorbed onto the walls of polypropylene plates. ENR conjugated with labeled alkaline phosphatase (ALP) was used to compete with the ENR in milk for the limited specific capability of ENR antibody on plates by solid-phase antibody binding reaction. Through separating unbounded labeled antigen and determining of chemiluminescence, the content of the test antigen was calculated. According to the basic theory, AMPPD was used as the substrate of ALP for rapid determination of ENR residues in milk. **Results** The linear range was 350-1 000 pg/ml and the detection limit was 239.9 pg/ml provided by the proposed method. The relative standard deviation was less than 15% both in intra-assay and inter-assay. **Conclusion** There are good prospects of this method in the surveillance and analysis of ENR and other antibiotics residues.

**Key words:** Enrofloxacin; chemiluminescence enzyme immunoassay; drug residues; food; milk

收稿日期:2011-02-23

基金项目:河南省重大公益性科研招标项目

作者简介:张慧丽 女 硕士 研究方向为药物分析

通信作者:吴拥军 男 教授 研究方向为药物与食品分析 E-mail:wuyongjun@zzu.edu.cn